



X

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/82, A01H 5/00, C12N 9/10	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/44471 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. November 1997 (27.11.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/02513 (22) Internationales Anmeldedatum: 15. Mai 1997 (15.05.97) (30) Prioritätsdaten: 196 19 917.4 17. Mai 1996 (17.05.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KOSSMANN, Jens [DE/DE]; Golmer Fichten 9, D-14476 Golm (DE). STEUP, Martin [DE/DE]; Kaunstrasse 17 B, D-14163 Berlin (DE). DUWENIG, Elke [DE/DE]; Sternwaldstrasse 7, D-79102 Freiburg (DE). (74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Postfach 86 07 67, D-81634 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: POTATO PLANTS WITH REDUCED CYTOSOLIC STARCH PHOSPHORYLASE AND MODIFIED GERMINATION (54) Bezeichnung: KARTOFFELPFLANZEN MIT EINER VERRINGERTEN AKTIVITÄT DER CYTOSOLISCHEN STÄRKEPHOSPHORYLASE UND EINEM VERÄNDERTEN KEIMUNGSVERHALTEN (57) Abstract <p>The description relates to transgenic potato plants containing cells having a reduced cytosolic starch phosphorylase activity in comparison with wild types of plant. By comparison with tubers of wild plant types, tubers of such potato plants exhibit a drastically altered germination behaviour, resulting in an increased number of sprout ends and hence of stolones and tubers. Plants from such tubers give higher yields.</p> (57) Zusammenfassung <p>Es werden transgene Kartoffelpflanzen beschrieben, die Zellen mit einer im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen verringerten Aktivität der cytosolischen Stärkephosphorylase enthalten. Knollen derartiger Kartoffelpflanzen zeigen im Vergleich zu Knollen von Wildtyp-Pflanzen ein drastisch verändertes Keimungsverhalten, das zur Bildung einer erhöhten Anzahl von Sprossenden und folglich zu einer erhöhten Anzahl von Stolonen und Knollen führt. Pflanzen, die aus derartigen Knollen hervorgehen, führen zu einem gesteigerten Ertrag.</p>		

BEST AVAILABLE COPY

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauritanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Kartoffelpflanzen mit einer verringerten Aktivität der cytosolischen Stärkephosphorylase und einem veränderten Keimungsverhalten

Die vorliegende Erfindung betrifft transgene Kartoffelpflanzen, die Zellen mit einer im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen verringerten Aktivität der cytosolischen Stärkephosphorylase enthalten. Die Knollen derartiger Kartoffelpflanzen zeigen im Vergleich zu Knollen von Wildtyp-Pflanzen ein verändertes Keimungsverhalten, das zur Bildung einer erhöhten Anzahl von Sproßenden und folglich zu einer erhöhten Anzahl von Stolonen und Knollen führt. Weiterhin weisen solche Pflanzen einen erhöhten Ertrag auf.

Der Ertrag beim landwirtschaftlichen Anbau von Kartoffeln wird in erster Linie bestimmt durch die Anzahl der Sproßenden, die pro angelegter Knolle gebildet werden. Normalerweise bildet eine auskeimende Kartoffelknolle lediglich ein, zeitweise 2 bis 3, Sproßenden, wobei aufgrund der Apikaldominanz dieser Sproßenden das Wachstum weiterer potentiell vorhandener Seitensprosse unterdrückt wird. Ausgehend von den Sproßenden werden während des weiteren Wachstums der Kartoffelpflanzen Stolone gebildet, an denen später die Knollen gebildet werden. Da der Ernteertrag mit der Anzahl der durch die entwickelten Sprosse gebildeten Stolone korreliert, besteht ein Bestreben, die Keimung von Kartoffelpflanzen derart zu manipulieren, daß eine möglichst große Anzahl von "Augen" auskeimen und sich zu Sproßenden entwickeln. Eine Methode besteht darin, den zuerst gebildeten Sproß einer Knolle, der aufgrund seiner Apikaldominanz das Wachstum weiterer Sproßenden unterdrückt, abzubrechen. Dies führt zum Wachstum weiterer Sproßenden. Eine weitere Methode besteht in dem Vorkeimen der zum Auslegen bestimmten Kartoffel-

feln unter regulierten Bedingungen in speziellen Behältern (siehe z.B. Bouman, Kartoffelbau 47 (1996), 18-21; van de Waart, Kartoffelbau 44 (1993), 18-20). Derartige Methoden sind jedoch sehr kostenintensiv, da sie neben den speziellen Behältern auch Lagerräume erfordern, in den sowohl die Licht- als auch die Temperaturbedingungen reguliert werden können. Im Zusammenhang mit der Unterdrückung der Knollenkeimung wurde bereits in der DE-A1 42 13 444 eine gentechnische Manipulation von Kartoffelpflanzen dahingehend vorgeschlagen, daß am Stärkemetabolismus beteiligte Enzyme inhibiert werden. Entsprechende Ansätze für eine verstärkte Sproßbildung der Kartoffelknollen sind bisher jedoch nicht bekannt. Es besteht somit ein Bedarf an Kartoffelpflanzen bzw. Verfahren, bei denen sich die obenbeschriebenen arbeits- bzw. kostenintensiven Schritte erübrigen und die zu einer erhöhten Sproßanzahl und somit erhöhtem Knollenertrag führen.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, Kartoffelpflanzen zur Verfügung zu stellen, deren Knollen bei Keimung eine hohe Anzahl von Sproßenden bilden.

Diese Aufgabe wird durch die in den Patentansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

Somit betrifft die Erfindung transgene Kartoffelpflanzen, die Zellen mit einer im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen, d.h. entsprechenden nicht-transformierten Pflanzen, um mindestens 60 % verringerten Aktivität der cytosolischen Stärkephosphorylase enthalten. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Aktivität der cytosolischen Stärkephosphorylase um mindestens 80 % und besonders bevorzugt um mindestens 95 % verringert im Vergleich zu Wildtyp-Kartoffelpflanzen.

Unter dem Begriff "cytosolische Stärkephosphorylase" wird die im Cytoplasma von Pflanzenzellen lokalisierte Isoform der Stärkephosphorylase (EC 2.4.1.1) verstanden, die auch

als Isoform H oder I bekannt ist. Von der zweiten, der plastidären Isoform unterscheidet sich diese dadurch, daß sie beispielsweise eine wesentlich höhere Affinität für hochverzweigte Glucane zeigt (Shimomura et al., J. Biochem. (Tokyo) 91 (1982), 703-717; Yang und Steup, Plant Physiol. 94, 960-969) und eine geringe Affinität zu Oligoglucanen. Das Enzym katalysiert die reversible Phosphorolyse von α -1,4-Glucanen. Die Aktivität der Stärkephosphorylase läßt sich beispielsweise bestimmen wie beschrieben in Parvin und Smith (Anal. Biochem. 27 (1969), 65-72), Conrads et al. (Biochim. Biophys. Acta 882 (1986), 452-463), Steup und Latzko (Planta 145 (1979), 69-75), Steup (In. Methods in Plant Biochemistry 3; Academic Press Limited (1990), 103-128) oder Sonnewald et al. (Plant Mol. Biol. 27 (1995), 567-576). Erfindungsgemäß ist die Aktivität der cytosolischen Stärkephosphorylase vorzugsweise in allen bzw. in fast allen Zellen der Pflanze verringert. Zumindestens jedoch in den Knollen und den sich aus diesen entwickelnden Sproßenden.

Es wurde überraschend gefunden, daß Knollen von Kartoffelpflanzen, die eine derart verringerte Aktivität der cytosolischen Stärkephosphorylase aufweisen, im Vergleich zu Knollen von Wildtyp-Pflanzen ein drastisch verändertes Keimungsverhalten zeigen. Unter Keimung wird hierbei das Auswachsen von Sproßenden aus Knollen verstanden.

Das veränderte Keimungsverhalten zeigt sich darin, daß derartige Knollen

- (a) zum einen im Durchschnitt pro Knolle mehr Sprosse ausbilden; und/oder
- (b) im Durchschnitt pro Knolle mehr Augen (d.h. die an den Knollen vorhandenen Sproßknospen) auskeimen und zur Bildung von Sprossen führen; und/oder
- (c) im Durchschnitt pro auskeimendem Knollenauge mehr Sproßenden gebildet werden, insbesondere, wenn die Keimung nach Lagerung für 5 Monate bei 20°C im Dunkeln erfolgt.

Wie bereits oben erläutert, bilden Knollen von Wildtyp-Pflanzen beim normalen Auskeimen in der Regel 1, maximal 2 bis 3, Sproßenden. Zur Erhöhung der Anzahl der Sproßenden ist entweder die Eliminierung des Apikalsprosses oder eine Vorkeimung unter speziellen Bedingungen notwendig. Hingegen zeigen Knollen der erfindungsgemäßen Kartoffelpflanzen, die Zellen mit einer verringerten cytosolischen Stärkephosphorylase enthalten, bei Keimung, insbesondere nach Lagerung bei 20°C im Dunkeln, eine drastisch erhöhte Anzahl von Sproßenden. Dies führt zur Ausbildung von mehr Stolonen und folglich zu mehr Knollen pro Pflanze. Insgesamt steigt damit der Knollenertrag pro Pflanze. Dies betrifft sowohl die Anzahl der Knollen pro Pflanze, als auch das Gesamtfrischgewicht von Knollen pro Pflanze.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist bei den erfindungsgemäßen Kartoffelpflanzen die durchschnittliche Anzahl der Sprosse, die pro Knolle gebildet werden, wenn die Keimung nach einer Lagerung von 5 Monaten bei 20°C im Dunkeln erfolgt, mindestens verdoppelt im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen, d.h. entsprechenden nicht-transformierten Pflanzen.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist bei den Knollen der erfindungsgemäßen Kartoffelpflanzen die Anzahl der Sproßenden, die pro auskeimendem Auge gebildet werden, wenn die Keimung nach einer Lagerung von 5 Monaten bei 20°C im Dunkeln erfolgt, mindestens verdoppelt im Vergleich zu Knollen von Wildtyp-Pflanzen, d.h. entsprechenden nicht-transformierten Pflanzen.

Neben dem veränderten Keimungsverhalten weisen die erfindungsgemäßen Pflanzen auch einen gesteigerten Ertrag hinsichtlich der Knollenanzahl sowie des Knollengewichtes auf. Dabei ist die Anzahl der Knollen pro Pflanze vorzugsweise um mindestens 20 %, bevorzugt um mindestens 50 % und besonders bevorzugt um mindestens 100 % höher als in entsprechenden

nicht-transformierten Pflanzen unter gleichen Wachstumsbedingungen.

Ferner ist das Knollenfrischgewicht aller Knollen pro Pflanze vorzugsweise um mindestens 10 %, vorzugsweise um mindestens 15 % und besonders bevorzugt um mindestens 20 % höher als bei entsprechenden nicht-transformierten Pflanzen unter gleichen Wachstumsbedingungen.

Die Verringerung der Aktivität der cytosolischen Stärkephosphorylase in den Zellen der erfindungsgemäßen Kartoffelpflanzen läßt sich prinzipiell durch verschiedene, dem Fachmann bekannte Methoden erreichen.

In einer bevorzugten Ausführungsform erfolgt die Verringerung der Aktivität der cytosolischen Stärkephosphorylase durch die Inhibierung der Expression endogener Gene, die dieses Enzym codieren. Bevorzugt sind hierbei molekularbiologische Techniken, die auf einem antisense-, Ribozym- oder einem Cosuppressionseffekt beruhen. Bei einem antisense-Effekt wird eine entsprechende RNA in antisense-Orientierung exprimiert. Diese hat vorzugsweise eine Länge von mindestens 30 Nucleotiden, bevorzugt von mindestens 50 Nucleotiden und besonders bevorzugt von mindestens 100 Nucleotiden. Die exprimierte antisense-RNA sollte eine hohe Homologie zu den endogen in der Pflanze exprimierten Transkripten, die cytosolische Stärkephosphorylase codieren, haben. Die Homologie beträgt vorzugsweise mindestens 90 %, bevorzugt mindestens 95 % und besonders bevorzugt mindestens 99 %. Bei einem Ribozym-Effekt wird eine RNA exprimiert, die spezifisch Transkripte cytosolischer Stärkephosphorylase spalten kann. Die Expression von Ribozymen zur Verringerung der Aktivität von bestimmten Enzymen in Zellen ist dem Fachmann ebenfalls bekannt und ist beispielsweise beschrieben in EP-B1 0 321 201. Die Expression von Ribozymen in pflanzlichen Zellen wurde z.B. beschrieben in Feyter et al. (Mol. Gen. Genet. 250 (1996), 329-338). Der Cosuppressions-Effekt beruht auf der Expression einer sense-RNA, die die Expression

von endogener Stärkephosphorylase-mRNA unterdrückt. Die Ausführung dieser Techniken sind dem Fachmann bekannt. Das Verfahren der Cosuppression ist beispielsweise beschrieben in Jorgensen (Trends Biotechnol. 8 (1990), 340-344), Niebel et al. (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 91-103), Flavell et al. (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 43-46), Palaqui und Vaucheret (Plant. Mol. Biol. 29 (1995), 149-159), Vaucheret et al. (Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 311-317), de Borne et al. (Mol. Gen. Genet. 243 (1994), 613-621) und anderen Quellen.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird die Verringerung der Aktivität einer cytosolischen Stärkephosphorylase in den Zellen dadurch erreicht, daß man transgene Kartoffelpflanzen erzeugt, die stabil ins Genom integriert ein rekombinantes DNA-Molekül enthalten, das folgende Elemente umfaßt:

- (a) einen Promotor, der die Transkription zumindest in Zellen der Knollen von Kartoffelpflanzen ermöglicht; und
- (b) eine in antisense-Orientierung mit diesem Promotor verknüpfte DNA-Sequenz, deren Transkripte ganz oder teilweise komplementär sind zu Transkripten eines endogen in Kartoffelpflanzenzellen vorliegenden Gens, das cytosolische Stärkephosphorylase codiert.

Promotoren, die die Expression in pflanzlichen Zellen gewährleisten sind in großem Umfang beschrieben. Für eine Expression in den Knollen der Kartoffelpflanzen bietet sich beispielsweise der Promotor des Patatingens B33 aus Kartoffel an (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29). Für eine konstitutive Expression eignet sich z.B. der 35S-Promotor des CaMV (Franck et al., Cell 21 (1980), 285-292).

DNA-Sequenzen, die eine cytosolische Stärkephosphorylase aus Kartoffel codieren sind bereits beschrieben (siehe z.B. Mori et al., J. Biol. Chem. 266 (1991), 18446-18453). Mit Hilfe dieser DNA-Sequenzen ist es dem Fachmann möglich mittels gängiger Verfahren weitere Sequenzen zu isolieren, die cyto-

solische Stärkephosphorylase aus Kartoffel codieren, falls dies erforderlich ist.

Neben den obengenannten Möglichkeiten kann die Verringerung der Aktivität der cytosolischen Stärkephosphorylase auch durch Inaktivierung der endogen vorhandenen Gene, die dieses Enzym codieren, erreicht werden. Techniken hierfür sind beispielsweise Transposonmutagenese oder gene-tagging.

Alternativ besteht auch die Möglichkeit, in den Zellen Antikörper zu exprimieren, die spezifisch cytosolische Stärkephosphorylase erkennen.

Verfahren zur Herstellung transgener Kartoffelpflanzen sind in der Literatur beschrieben, siehe z.B. (Rocha-Sosa (loc.cit.)). Bevorzugt wird die Transformation mittels Agrobakterien angewandt.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Vermehrungsmaterial der erfindungsgemäßen Kartoffelpflanzen, insbesondere Samen und besonders bevorzugt Kartoffelknollen. Diese enthalten Zellen mit einer im Vergleich zu Knollen von Wildtyp-Pflanzen verringerten Aktivität der cytosolischen Stärkephosphorylase und ein wie oben beschriebenes verändertes Keimungsverhalten auf.

Schließlich betrifft die Erfindung auch die Verwendung von Nucleinsäuremolekülen, die eine cytosolische Stärkephosphorylase codieren oder Teile davon zur Herstellung von transgenen Kartoffelpflanzen mit einer verringerten Aktivität der cytosolischen Stärkephosphorylase, insbesondere um mindestens 60 % im Vergleich zu entsprechenden nicht-transformierten Pflanzen, vorzugsweise um mindestens 80 % und besonders bevorzugt um mindestens 95 % und einem verändertem Keimungsverhalten.

Beschreibung der Figuren.

- Figur 1 zeigt schematisch das Plasmid pBin-Anti-STPI^{Km}. cSTP 1,7: ca. 1,7 kb langes DNA-Fragment, das einen Teil der codierenden Region für cytosolische Stärkephosphorylase aus Kartoffel umfaßt und in antisense-Orientierung mit dem 35S-Promotor verknüpft ist.
- Figur 2 zeigt zwei Polyacrylamidgele zum Nachweis der Aktivität der cytosolischen Stärkephosphorylase in Blatt-(A) und Knollengewebe (B) transgener Kartoffelpflanzen, die mit dem Plasmid pBin-Anti-STPI^{Km} transformiert sind. Proteinrohextrakte von Blatt- und Knollengewebe wurden in einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel (diskontinuierliches System; 12 % bzw. 4 % (Gew./Vol.) Acrylamid) aufgetrennt. Das Trenngel enthielt 2,4 % (Gew./Vol.) Glykogen. Es wurden ca. 20 µg Protein pro Spur aufgetragen. Die Elektrophorese wurde für 4 h bei 100 Volt durchgeführt. Die Wanderungsrichtung ist von oben (Kathode) nach unten (Anode). Für die Aktivitätsfärbung wurden die Gele in 20 mM Glucose-1-Phosphat/100 mM Citrat, pH 6,0 bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Proteinbanden mit stärke-synthetisierender Aktivität werden als blaue Banden sichtbar. Die cytosolische Stärkephosphorylase (STPI) wird durch das immobilisierte Polysaccharid stark in seiner Mobilität gehemmt. Die plastidäre Stärkephosphorylase (STPII) ist dagegen in ihrer Wanderungsgeschwindigkeit nicht so stark beeinträchtigt.
- Figur 3 zeigt im Vergleich das Keimungsverhalten von Knollen von Wildtyp-Pflanzen (*S. tuberosum* L. cv Désirée; rechts) im Vergleich zu Knollen der

transformierten Linie cSTP 9 (links) nach einer Lagerung von 5 Monaten bei 20°C im Dunkeln.

Figur 4 zeigt im Vergleich das Keimungsverhalten von Knollen von Wildtyp-Pflanzen (Mitte) im Vergleich zu Knollen der transformierten Linien cSTP 6 (links) und cSTP 7 (rechts) nach einer Lagerung von 10 Monaten bei 20°C im Dunkeln.

Figur 5 zeigt eine statistische Übersicht über die Anzahl der im Durchschnitt pro Knolle bzw. pro 25 Knollen gebildeten Sproßenden bei Knollen von Wildtyp-Pflanzen (cDesi) bzw. den transformierten Linien (cSTP-6, -7, -9, -14, -15, -16 und -18) nach einer Lagerung von 5 Monaten bei 20°C im Dunkeln.

Figur 6 zeigt eine statistische Übersicht über die durchschnittliche Anzahl der pro "Auge" gebildeten Sproßenden bei Knollen von Wildtyp-Pflanzen (cDesi) und Knollen von transformierten Linien (cSTP-6, -7, -9, -14, -15, -16 und -18).

Die Beispiele erläutern die Erfindung.

In den Beispielen werden unter anderem folgende Materialien und Techniken verwendet.

1. Bakterienstämme

Für Clonierungen wurde der E.coli-Stamm DH5 α (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburgh, USA) verwendet.

Die Transformation der Plasmide in die Kartoffelpflanzen wurde mit Hilfe des Agrobacterium tumefaciens-Stammes C58C1 pGV2260 durchgeführt (Deblaere et al., Nucl. Acids Res. 13 (1985), 4777-4788).

2. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Der Transfer der DNA erfolgte durch direkte Transformation nach der Methode von Höfgen & Willmitzer (Nucleic Acids Res. 16 (1988), 9877). Die Plasmid-DNA transformierter *Agrobakterien* wurde nach der Methode von Birnboim, & Doly (Nucleic Acids Res. 7 (1979), 1513-1523) isoliert und nach geeigneter Restriktionsspaltung gelelektrophoretisch analysiert.

3. Transformation von Kartoffeln

Zehn kleine mit dem Skalpell verwundete Blätter einer Kartoffel-Sterilkultur (*Solanum tuberosum* L.cv. Désirée) wurden in 10 ml MS-Medium (Murashige & Skoog, Physiol. Plant 15 (1962), 473-497) mit 2 % Saccharose gelegt, welches 50 µl einer unter Selektion gewachsenen *Agrobacterium tumefaciens*-Übernachtskultur enthielt. Nach 3-5 minütigem, leichtem Schütteln erfolgte eine weitere Inkubation für 2 Tage im Dunkeln. Daraufhin wurden die Blätter zur Kallusinduktion auf MS-Medium mit 1,6 % Glucose, 5 mg/l Naphthylelessigsäure, 0,2 mg/l Benzylaminopurin, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin und 0,80 % Bacto Agar gelegt. Nach einwöchiger Inkubation bei 25°C und 3000 Lux wurden die Blätter zur Sproßinduktion auf MS-Medium mit 1,6 % Glucose, 1,4 mg/l Zeatinribose, 20 mg/l Naphthylelessigsäure, 20 mg/l Giberellinsäure, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin und 0,80 % Bacto Agar gelegt.

4. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe eines DNA-Randon Primer Labelling Kits der Firma Boehringer (Deutschland) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

5. Northern Blot-Analyse

RNA wurde nach Standardprotokollen aus Blattgewebe oder Knollengewebe von Pflanzen isoliert. 50 µg der RNA wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt (1,5 % Agarose, 1 x MEN-Puffer, 16,6 % Formaldehyd). Das Gel wurde nach dem Gellauf kurz in Wasser gewaschen. Die RNA wurde mit 20 x SSC mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran vom Typ Hybond N (Amersham, UK) transferiert. Die Membran wurde anschließend bei 80°C unter Vakuum für zwei Stunden gebacken.

Die Membran wurde in NSEB-Puffer für 2 h bei 68°C prähybridisiert und anschließend in NSEB-Puffer über Nacht bei 68°C in Gegenwart der radioaktiv markierten Probe hybridisiert.

6. Pflanzenhaltung

Kartoffelpflanzen werden im Gewächshaus unter folgenden Bedingungen gehalten:

Lichtperiode	16 h bei 25000 Lux und 22°C
Dunkelperiode	8 h bei 15°C
Luftfeuchte	60 %

Die Pflanzen werden in einzelnen Töpfen (200 cm², 15 cm tief) gehalten und täglich gewässert. Die Knollen werden 4 Monate nach dem Transfer der Gewebekulturpflanzen in das Gewächshaus geerntet. Für biochemische Analysen werden Knollen mit einem Frischgewicht von 8-16 g verwendet. Das Frischgewicht wird unmittelbar nach dem Ernten bestimmt. Die geernteten Knollen werden gewaschen und in Kisten bei 20°C für 5 bis 10 Monate im Dunkeln gelagert.

Beispiele

Beispiel 1

Konstruktion des Plasmids pBin-Anti-STPI^{Km}

Zur Herstellung eines antisense-Konstruktes, das eine antisense-RNA codiert zu Transkripten, die cytosolische Stärkephosphorylase aus Kartoffel codieren, wurde ein Teil der codierenden Region der in Mori et al. (loc. cit.) beschriebenen cDNA mittels PCR aus einer λ ZAP cDNA-Bibliothek aus Knollengewebe amplifiziert.

Ein 1,7 kb Asp718/SmaI-Fragment wurde mit glatten Enden in die SmaI-Schnittstelle des binären Pflanzentransformationsvektors pBIN19 (Bevan, Nucl. Acids Res. 12 (1984), 8711-8721) insertiert. Dieser enthält den 35S-Promotor des CaMV und das Polyadenylierungssignal des Octopinsynthase-Gens. Durch Restriktionsverdau wurde sichergestellt, daß die codierende Region in antisense-Orientierung zum Promotor angeordnet ist.

Das resultierende Konstrukt wurde als pBin-Anti-STPI^{Km} bezeichnet (siehe Figur 1).

Beispiel 2

Herstellung transgener Kartoffelpflanzen mit einer verringerten Aktivität der cytosolischen Stärkephosphorylase

Der Vektor pBin-Anti-STP^{Km} wurde mittels direkter Transformation in den Agrobacterium tumefaciens-Stamm C58C1: pGV2260 eingeführt (Höfgen und Willmitzer, Nucl. Acid Res. 16 (1988), 9877). Die Transformation und Regeneration transgener Kartoffelpflanzen erfolgte wie in Rocha-Sosa et al. (EMBO J. 8 (1989), 23-29) beschrieben. Es wurden mehrere unabhängig voneinander erzeugte transgene Linien hinsichtlich ihrer Eigenschaften getestet, insbesondere die Linien mit den Bezeichnungen cSTPI-6, -7, -9, -14, -15, -16 und -18.

Beispiel 3

Analyse transgener Kartoffelpflanzen mit einer verringerten Aktivität der cytosolischen Stärkephosphorylase

(a) Northern-Blot-Analyse

Von verschiedenen unabhängigen Linien der gemäß Beispiel 2 hergestellten transgenen Kartoffelpflanzen wurde Gesamt-RNA aus Blatt- bzw. Knollenmaterial isoliert und mittels Northern-Blot-Analyse hinsichtlich der Expression von mRNA analysiert, die cytosolische Stärkephosphorylase codiert. Im Vergleich zu Proben von Wildtyp-Pflanzen (*Solanum tuberosum* L. cv. Désirée), die ein starkes Signal bei der Hybridisierung, mit einer für cytosolische Stärkephosphorylase spezifischen Probe zeigten, konnten in fast allen der untersuchten transformierten Pflanzen keine bis fast keine Transkripte für cytosolische Stärkephosphorylase nachgewiesen werden.

(b) Nachweis der Aktivität der cytosolischen Stärkephosphorylase

Der Nachweis der Aktivität der cytosolischen Stärkephosphorylase in Geweben der transformierten Kartoffelpflanzen wurde nach der Methode von Steup (In: *Methods in Plant Biochemistry* 3, Academic Press Limited (1990), 103-128) durchgeführt. Hierzu wurden zunächst Proteinrohextrakte aus den zu untersuchenden Geweben gewonnen, indem gefrorenes Gewebe in Extraktionspuffer (100 mM HEPES-NaOH, pH 7,5; 1 mM EDTA, 10 % (Vol./Vol.) Glycerin; 5 mM DTT, 200 mg Na₂SO₃; 150 mg Na₂S₂O₅) homogenisiert. Nach Zentrifugation wurde der klare Überstand in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde durchgeführt wie in Steup und Latzko (*Planta* 145 (1979), 69-759) beschrieben. Hierbei wurde ein nicht-de-

naturierendes diskontinuierliches System verwendet (12 % bzw. 4 % (Gew./Vol.) Acrylamid). Das Trenngel enthielt 2,4 % (Gew./Vol.) Glycogen. Zum Nachweis der Aktivität der cytosolischen Stärkephosphorylase wurde das Gel nach dem Gellauf in einer Lösung von 20 mM Glucose-1-Phosphat/100 mM Citrat; pH 6,0 über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Gel in lugolscher Lösung für 5 min inkubiert. Entfärbung erfolgte durch extensives Waschen mit Wasser über einen längeren Zeitraum. Blaufärbung zeigt die Anwesenheit stärke synthetisierender Enzymaktivitäten an. Die Aktivität der cytosolischen Stärkephosphorylase kann beispielsweise anschließend durch densitometrische Analyse der entsprechenden Proteinbanden bestimmt werden.

Figur 2 zeigt ein Polyacrylamidgel in dem sieben unabhängige gemäß Beispiel 2 hergestellte transgene Kartoffellinien hinsichtlich ihrer Aktivität an cytosolischer Stärkephosphorylase getestet wurden.

(c) Untersuchung des Keimungsverhaltens von Knollen der erzeugten transgenen Kartoffelpflanzen

Zur Untersuchung des Einflusses der Verringerung der Aktivität der cytosolischen Stärkephosphorylase auf das Keimungsverhalten wurden Knollen der Pflanzen bei 20°C gelagert und das Keimungsverhalten der Knollen nach verschiedenen Zeiträumen untersucht.

Figur 3 zeigt im Vergleich Knollen von *Solanum tuberosum* L. cv. Désirée (Wildtyp), sowie Knollen der mit dem Plasmid pBin-Anti-STPI^{Km} transformierten Linie cSTPI-9, die jeweils 5 Monate bei 20°C gelagert worden waren.

Figur 4 zeigt im Vergleich Wildtyp-Knollen und Knollen von zwei anderen transformierten Linien (cSTPI-6 und cSTPI-7), die für 10 Monate bei 20°C gelagert worden sind.

Aus den beiden Figuren wird deutlich, daß die Knollen der transformierten Linien, die eine verringerte Aktivität der cytosolischen Stärkephosphorylase aufweisen, ein drastisch verändertes Keimungsverhalten aufweisen.

Die Knollen der transformierten Linien bilden zum einen wesentlich mehr Sproßenden pro Knolle und auch mehr Sproßenden pro auskeinemdem Auge aus. Ferner keimen bei den Knollen der transformierten Pflanzen mit verringerter Aktivität der cytosolischen Stärkephosphorylase in der Regel mehr Augen aus. Eine statistische Auswertung ist in den Figuren 5 und 6 dargestellt.

Die aus den Knollen der transformierten Pflanzen wachsenden Kartoffelpflanzen zeigen ferner einen erhöhten Ertrag (in Knollenfrischgewicht/Pflanze). Dies ist in der folgenden Tabelle dargestellt am Beispiel der transformierten Linien cSTP6, cSTP7, cSTP9, cSTP14, cSTP15, cSTP16 und cSTP18.

Tabelle I

<u>Pflanze</u>	<u>Anzahl der Knollen</u>	<u>Knollenfrischgewicht (g)</u>
Wildtyp	5,6 ± 1,5	69,0 ± 9,0
cSTP6	13,5 ± 2,7	95,0 ± 12,0
cSTP7	10,8 ± 1,9	90,5 ± 8,6
cSTP9	10,0 ± 1,4	92,5 ± 9,1
cSTP14	9,6 ± 3,5	93,8 ± 12,4
cSTP15	12,8 ± 5,0	94,5 ± 8,8
cSTP16	8,8 ± 0,8	92,5 ± 5,6
cSTP18	11,3 ± 1,3	82,5 ± 8,3

Die Daten wurden von unabhängigen Pflanzen erhalten, die von individuellen Saatgutknollen propagiert worden waren. Knollen mit 10-40 g Frischgewicht von nicht seneszenten Pflanzen wurden geerntet. Die Werte sind Mittelwerte von unabhängigen Pflanzen (n = 4-8) mit Angabe der Standardabweichung.

Aus der Tabelle geht hervor, daß Pflanzen mit einer verringerten Aktivität der cytosolischen Stärkephosphorylase zum einen mehr Knollen pro Pflanze ausbilden als

Wildtyp-Pflanzen und darüber hinaus das Knollenfrischgewicht pro Pflanze wesentlich höher ist als bei Wildtyp-Pflanzen.

Die transformierten Kartoffelpflanzen unterscheiden sich hinsichtlich der in den Knollen gebildeten Stärke nicht von Wildtyp-Pflanzen.

P a t e n t a n s p r ü c h e

1. Transgene Kartoffelpflanze, die Zellen mit einer im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen um mindestens 60 % verringerten Aktivität der cytosolischen Stärkephosphorylase enthält.
2. Transgene Kartoffelpflanze nach Anspruch 1, deren Knollen im Vergleich zu Knollen von Wildtyp-Pflanzen ein verändertes Keimungsverhalten aufweisen.
3. Transgene Kartoffelpflanze nach Anspruch 1 oder 2, deren Knollen sich bei Keimung von Knollen von Wildtyp-Pflanzen dadurch unterscheiden, daß
 - (a) im Durchschnitt pro Knolle mehr Sprosse gebildet werden; und/oder
 - (b) im Durchschnitt pro Knolle mehr Augen auskeimen und zur Bildung von Sprossen führen; und/oder
 - (c) im Durchschnitt pro auskeimenden Knollenaugen mehr sproßenden gebildet werden.
4. Transgene Kartoffelpflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die durchschnittliche Anzahl der Sprosse, die pro Knolle gebildet werden, wenn die Keimung nach einer Lagerung von 5 Monaten bei 20°C im Dunkeln erfolgt, mindestens verdoppelt ist im Vergleich zu Knollen von Wildtyp-Pflanzen.
5. Transgene Kartoffelpflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Anzahl der sproßenden, die pro auskeimendem Auge gebildet werden, wenn die Keimung nach einer Lagerung von 5 Monaten bei 20°C im Dunkeln erfolgt, mindestens verdoppelt ist im Vergleich zu Knollen von Wildtyp-Pflanzen.

6. Transgene Kartoffelpflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 5, die im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen eine erhöhte Anzahl an Knollen sowie ein gesteigertes Knollenfrischgewicht aufweist.
7. Transgene Kartoffelpflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei die Verringerung der Aktivität der cytosolischen Stärkephosphorylase in den Zellen erreicht wird durch die Inhibierung der Expression endogener Gene, die dieses Enzym codieren.
8. Transgene Kartoffelpflanze nach Anspruch 7, wobei die Inhibierung mittels eines antisense-, Ribozym- oder Co-suppressions-Effektes erreicht wird.
9. Transgene Kartoffelpflanze nach Anspruch 8, die stabil ins Genom integriert ein rekombinantes DNA-Molekül enthält, das folgende Elemente umfaßt:
 - (a) einen Promotor, der die Transkription zumindest in Zellen der Knollen von Kartoffelpflanzen ermöglicht; und
 - (b) eine in antisense-Orientierung mit diesem Promotor verknüpfte DNA-Sequenz, deren Transkripte ganz oder teilweise komplementär sind zu Transkripten eines endogen in Kartoffelpflanzenzellen vorliegenden Gens, das cytosolische Stärkephosphorylase codiert.
10. Vermehrungsmaterial einer transgenen Kartoffelpflanze nach einem der Ansprüche 1 bis 9, das die Reproduktion von Pflanzen nach einem der Ansprüche 1 bis 9 erlaubt.
11. Vermehrungsmaterial nach Anspruch 10, das eine Knolle mit den in einem der Ansprüche 1 bis 6 beschriebenen Eigenschaften ist.

12. Verwendung von Nucleinsäuremolekülen, die eine cytosolische Stärkephosphorylase codieren oder Teile davon zur Herstellung von transgenen Kartoffelpflanzen mit einer verringerten Aktivität der cytosolischen Stärkephosphorylase und einem veränderten Keimungsverhalten.

1/5

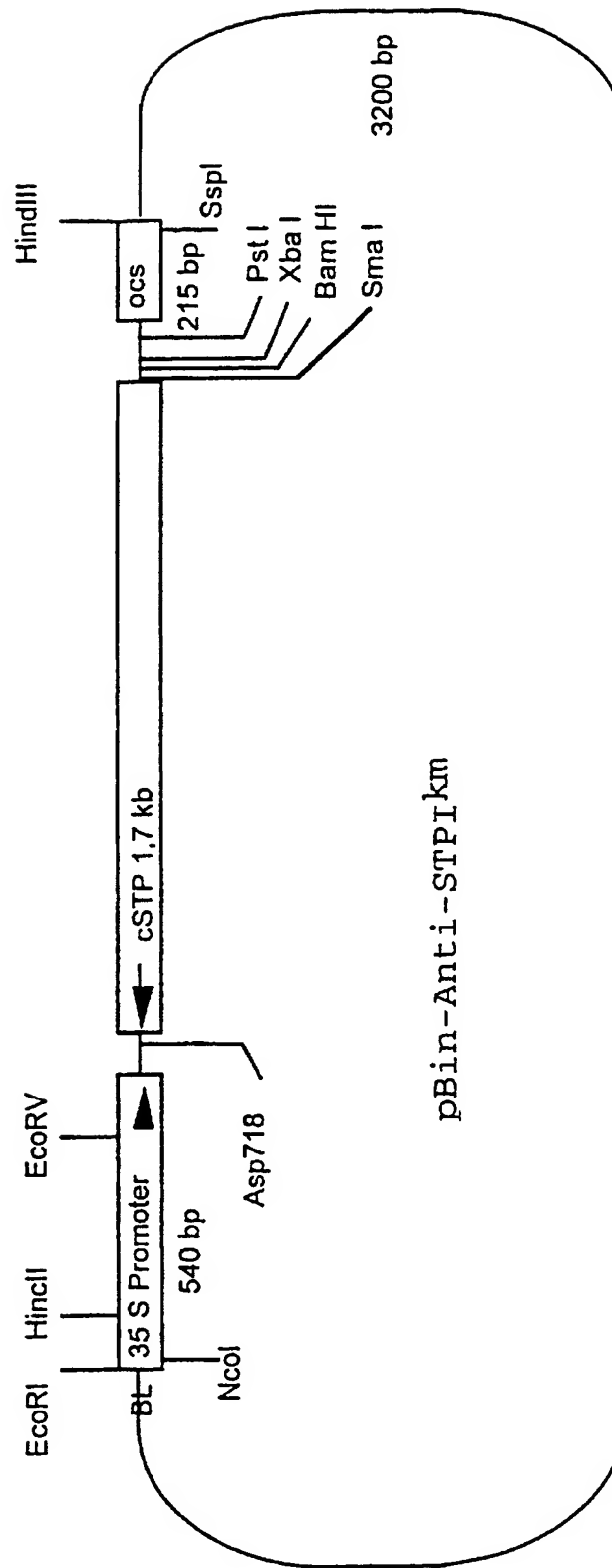
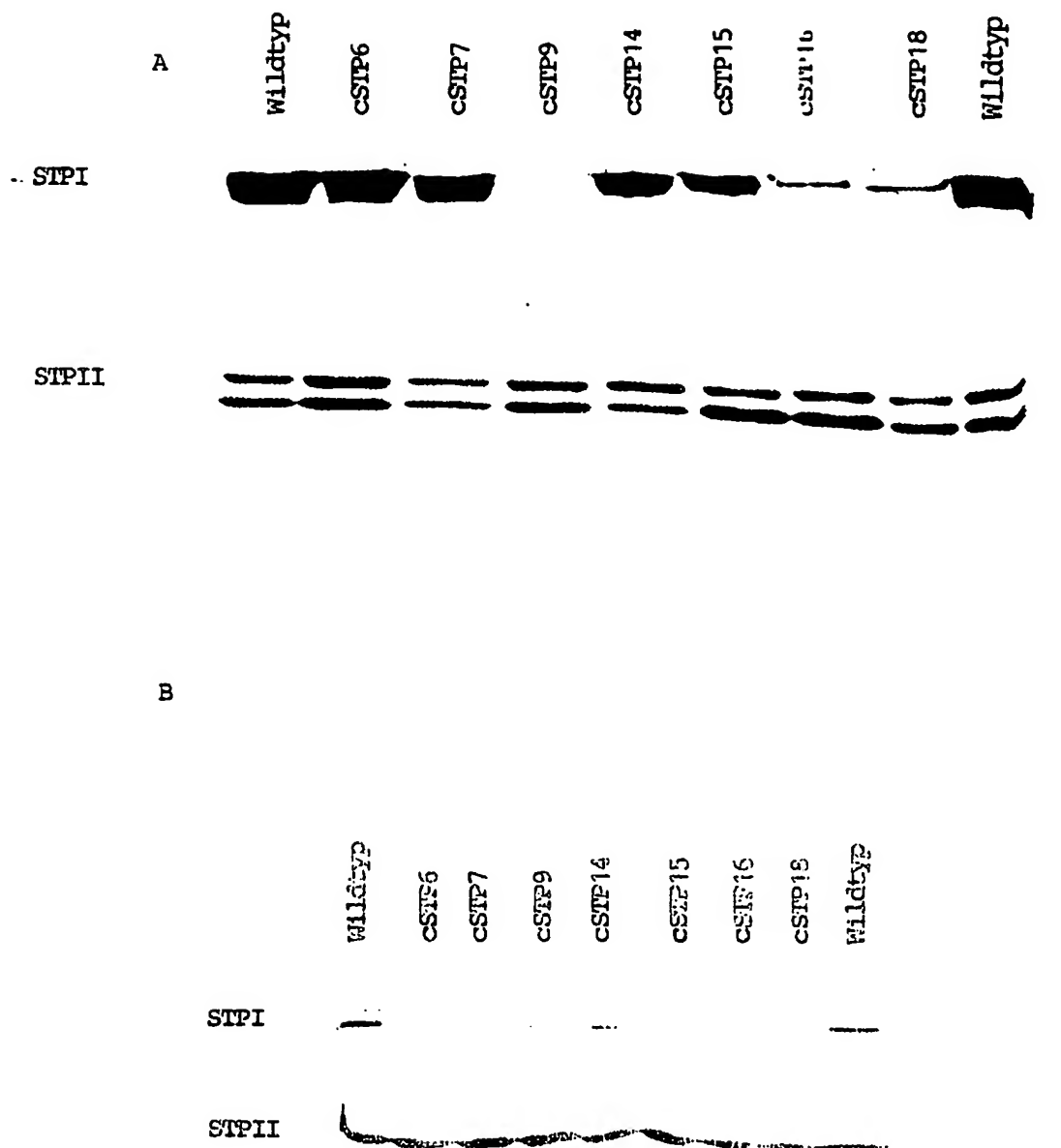


Figure 1

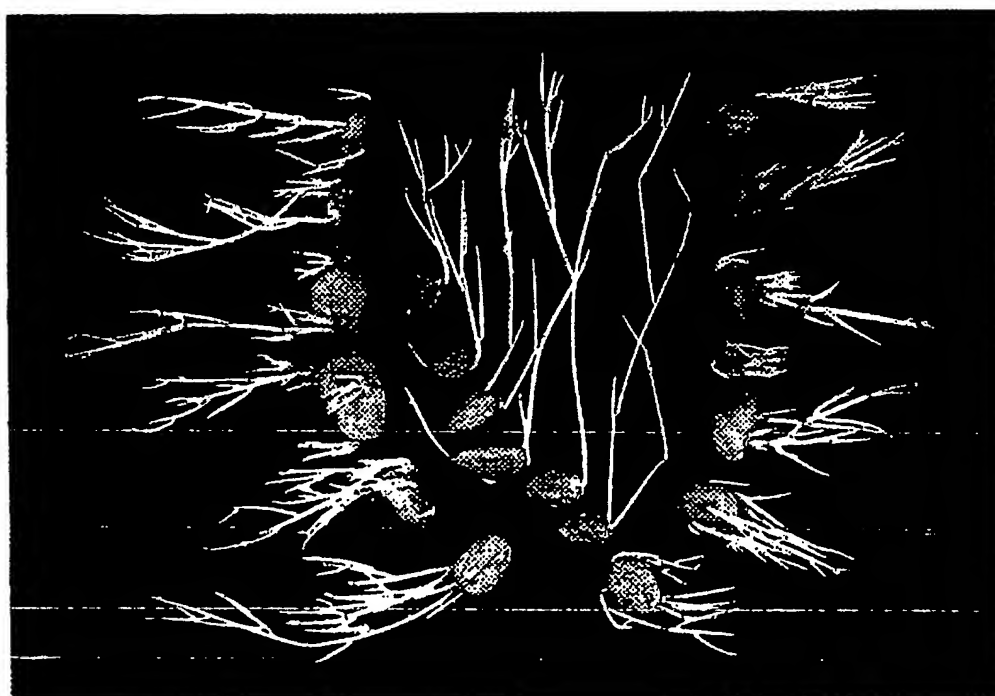
2/5



Figur 2

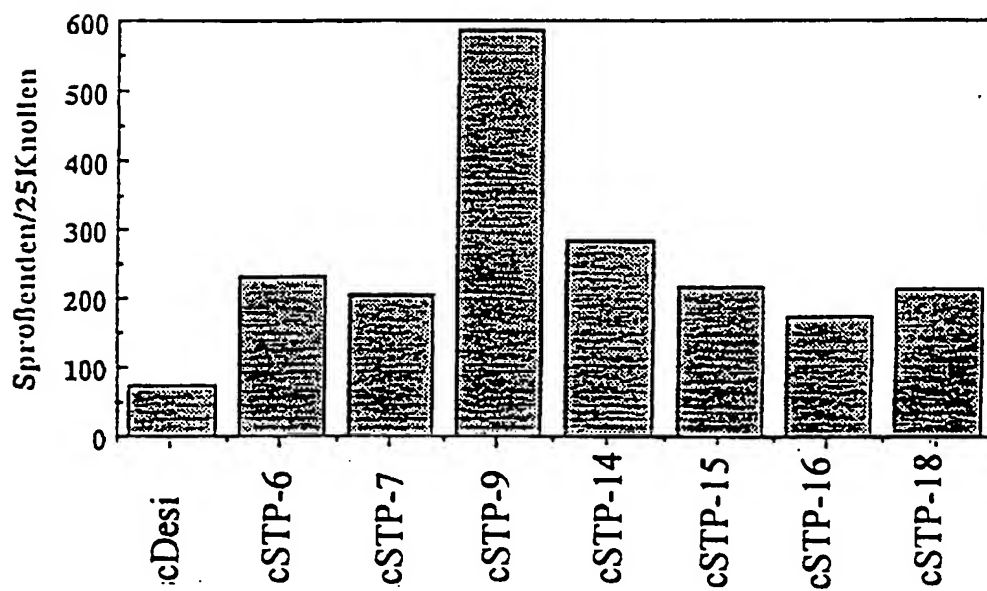
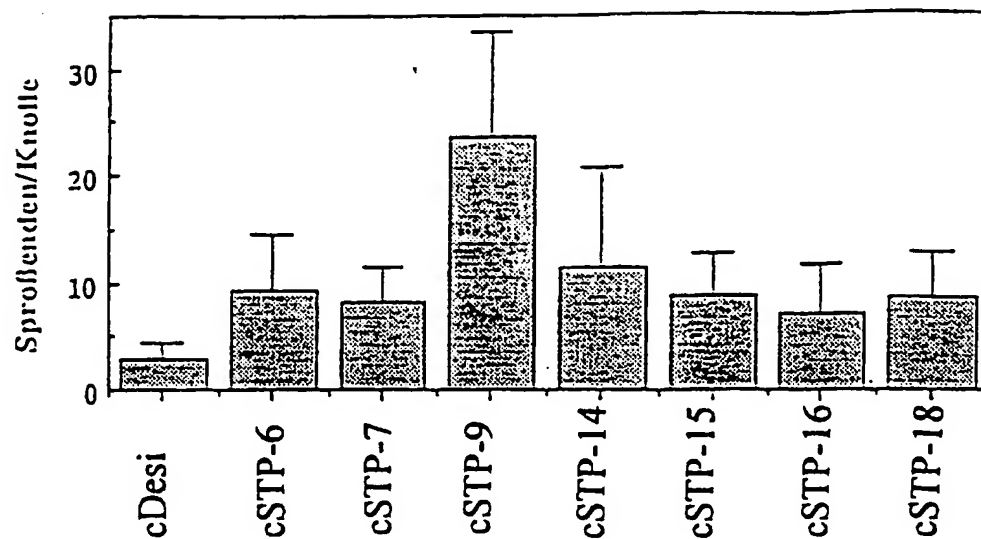


Figur 3



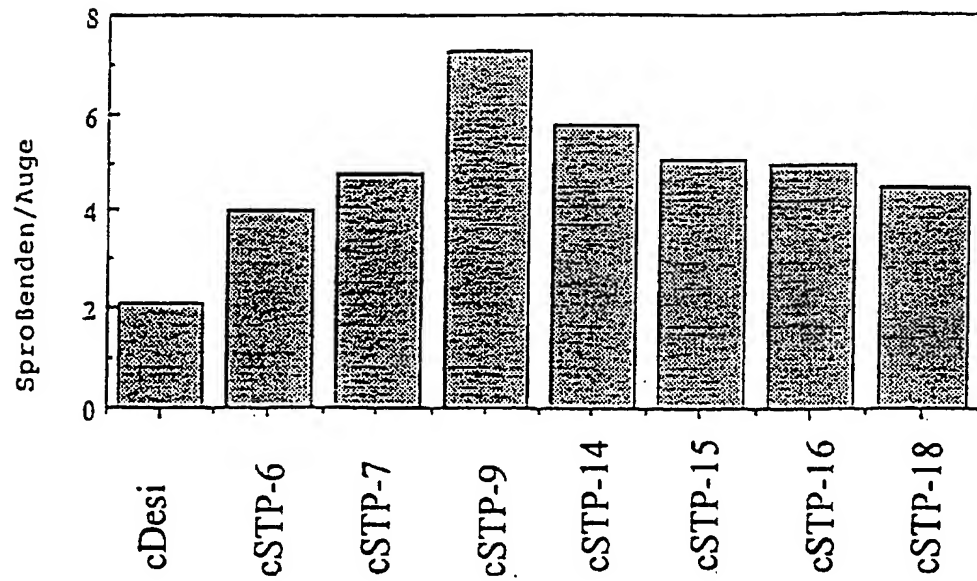
Figur 4

4/5



Figur 5

5/5



Figur 6

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)